

# **Anti-IFN- $\alpha$ 2a autovasta-aineet kroonisessa käänteishyljinnässä**

Joona Sarkkinen

Lääketieteen kandidaatti

Helsingin Yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Helsinki

Tutkielma

[joona.sarkkinen@helsinki.fi](mailto:joona.sarkkinen@helsinki.fi)

Ohjaaja: Eliisa Kekäläinen, Dos.

Helsingin Yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Lääketieteellinen tiedekunta		Helsingin Yliopisto	
Tekijä – Författare – Author			
Joona Sarkkinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Anti-IFN- $\alpha$ 2a autovasta-aineet kroonisessa kääntheishyljinnässä			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Immunologia			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages	
Syventävä tutkielma	02/2018	22 + 1	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Pahanlaatuisten veritautien ja luuytimen syöpien hoidossa käytetään allogeenista eli toiselta yksilöltä peräisin olevaa verta muodostavien kantasolujen siirrettä. Elintärkeän siirteen sivuvaikutuksena potilaalle voi kehittyä kääntheishyljintäreaktio, jossa luovuttajan puolustusjärjestelmän solut vaurioittavat potilaan kudusrakenteita. Vaurioita kehittyä myös kateenkorvaan, elimeen, jossa immuunijärjestelmälle tärkeät T-solut kehittyvät ja ”koulutautuvat”. Kääntheishyljintäreaktion edetessä kateenkorva vaurioituu, minkä seurauksena elimistöön voi vapautua myös omia rakenteita vaurioittavia eli autoreaktiivisia T-soluja.</p> <p>Tiedetään, että T-solujen koulutus on häiriintynyt autoimmuunipolyendokrinopatia-kandidiaasi-ektodermidystrofiassa eli APECED:ssa (toiselta nimeltään APS1-oireyhtymä) sekä kateenkorvan epiteelisolujen kasvaimissa eli tymoomissa. APECED on autosomaalisesti peittyvästi periytyvä yhden geenin mutaation aiheuttama autoimmuunisairaus, jossa autoreaktiiviset T-solut aiheuttavat kudosaivurioita. Näissä sairauksissa potilailla on myös omia puolustusjärjestelmän sytokiineja estäviä vasta-aineita, niin kutsuttuja antisytokiini autovasta-aineita. Ajatellaan, että autoreaktiiviset T-solut osallistuvat kyseisten autovasta-aineiden muodostumiseen. Koska kääntheishyljintäreaktio muistuttaa kateenkorvavaurioiltaan hieman APECED:a ja tymoomaa, syventävän projektini hypoteesina oli, että myös kroonisen kääntheishyljintäreaktion potilailta löytyisi samoja antisytokiini autovasta-aineita kuin APECED:ssa ja tymoomassa. Huomio kiinnitettiin IFN-<math>\alpha</math> 2a autovasta-aineeseen, mikä on yleisimpiä antisytokiini autovasta-aineita näissä sairauksissa.</p> <p>Tutkimusaineisto koostui 20:stä allogeenisen kantasolusiirteen saaneiden potilaiden seerumista, joista 18 kärsi kroonisesta kääntheishyljinnästä. IFN-<math>\alpha</math> 2a autovasta-aineen havaitsemiseksi käytettiin entsyymivälitteistä immunosorbenttianalyysiä, eli niin kutsuttua ELISA-menetelmää.</p> <p>Tutkimustulos oli negatiivinen eli potilasnäytteet eivät sisältäneet IFN-<math>\alpha</math> 2a autovasta-ainetta. Tutkimushypoteesi oli täten väärä eli krooniseen kääntheishyljintäreaktioon liittyvä kateenkorvavaurio ei aiheuta samanlaisia immunologisia vaikutuksia kuin APECED tai tymooma. Kateenkorvavaurion etiologia ja vaikutukset kääntheishyljintäreaktiossa jäivät vielä avoimeksi ja selvittämiseksi vaaditaan tarkempaa</p>			

<p>solutason tutkimusta. Voi myös olla, että antisytokiini autovasta-aineiden muodostumiseen vaikuttavat muut, toistaiseksi tuntemattomat tekijät.</p>
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Autoimmunity, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Autoantibodies, Graft vs Host Disease, Thymus Gland</p>
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p>
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p>

## Sisällysluettelo

<b>JOHDANTO .....</b>	<b>5</b>
<b>KIRJALLISUUSKATSAUS.....</b>	<b>6</b>
Kateenkorvan eli tyymuksen rakenne ja toiminta.....	6
Käänteishyljintä .....	7
Akuutti käänteishyljintä.....	7
Akuutin GVHD:n vaikutukset tyymukseen.....	10
Krooninen käänteishyljintä .....	10
APECED .....	12
Antisytokiini autovasta-aineet.....	13
<b>TAVOITTEET .....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAALI JA MENETELMÄT .....</b>	<b>16</b>
Tutkimusmenetelmät.....	16
Potilasaineisto .....	17
Reagenssit .....	17
Työn kulku .....	19
<b>TULOKSET .....</b>	<b>20</b>
<b>POHDINTA.....</b>	<b>23</b>
<b>LÄHTEET.....</b>	<b>24</b>

## JOHDANTO

Allogeeniset eli eri yksilöltä peräisin olevat hematopoieettiset kantasolusiirrot ovat yleistyneet viime vuosikymmeninä pahanlaatuisten veritautien ja luuytimen syöpien hoidossa. Hoidon haittavaikutuksena potilaille kehittyy usein käänteishyljintäreaktio, jossa siirteen yhteydessä saadut luovuttajan T-solut kohdistavat reaktion potilaan omia kudoksia vastaan. Kudosvaurioita kohdistuu myös kateenkorvaan eli tyymukseen, elimeen, jossa tapahtuu T-solujen kehitys ja koulutus. Kehityksen ansiosta yksittäiset T-solut kykenevät kukin tunnistamaan omaa tiettyä antigeeniä, jota kohtaan ne aikaansaavat immuunivasteensa. Osa kehittyvistä T-soluista tunnistaa elimistön omia kudosrakenteita vieraina, jolloin ne elimistöön päästessään voivat kohdistaa immuunireaktion näitä rakenteita kohtaan ja aiheuttaa kudosvaurioita. Nämä niin kutsutut autoreaktiiviset T-solut tuhotaan kuitenkin pois kehityksen loppuvaiheen negatiivisessa selektiossa. Käänteishyljinnän tyymusvaurion epäillään aiheuttavan negatiivisen selektion häiriön, jolloin normaalien T-solujen lisäksi myös autoreaktiivisia T-soluja pääsee muualle elimistöön.

Autoimmuunipolyendokrinopatia-kandidiaasi-ektodermidystrofiassa eli APECED:ssa (APS1-syndrooma) sekä tyymuksen epiteelisolujen kasvaimissa eli tymoomissa tiedetään negatiivisen selektion olevan vajaata. APECED:ssa tämä ilmenee autoreaktiivisten T-solujen aiheuttamina kudosvaurioina. Molemmissa sairauksissa muodostuu lisäksi antisytokiini autovasta-aineita (aCA), jotka estävät vastinsytokiiniensa vaikutuksia. aCA:n ajatellaan muodostuvan autoreaktiivisten T-solujen ja vasta-aineita tuottavien B-solujen yhteistyön vaikutuksesta.

On mahdollista, että myös käänteishyljintäpotilailla muodostuu aCA:a häiriintyneen negatiivisen selektion seurauksena. Toistaiseksi on kuitenkin epäselvää mitä kaikkea käänteishyljintäreaktion tyymusvaurio aiheuttaa T-solujen kehitykselle ja miten autoreaktiiviset T-solut tarkalleen muodostuvat. Lisäksi ei tiedetä kuinka ja miksi aCA:t muodostuvat APECED:ssa, tymoomassa tai yleisesti.

Tutkimuksessa selvitimme entsyymivälitteisellä immunosorbenttianalyysillä (ELISA-menetelmällä) löytyykö allogeenisen hematopoieettisen kantasolusiirteen saaneiden, kroonista käänteishyljintää sairastavien potilaiden seerumista samaa antisytokiini autovasta-ainetta, IFN- $\alpha$  2a aCA, kuin APECED- sekä tymoomapotilailta. IFN- $\alpha$  2a aCA on yleisimpiä aCA:a näissä sairauksissa. Tarkoituksenamme on selvittää kroonisen käänteishyljinnän patogeneesia, sekä selittää aCA:n muodostumista ja merkitystä.

# KIRJALLISUUSKATSAUS

## Kateenkorvan eli tyymuksen rakenne ja toiminta

Tyymus sijaitsee rintaontelossa sydämen yläpuolella, ja se vastaa tymopoieesista eli T-solujen kehityksestä. Se koostuu useista eri lohkoista, joita ympäröi sidekudoksinen kapseli. Lohkoissa on selkeästi erotettavissa ulompi kuorikerros eli korteksi, sekä sisempi ydinkerros eli medulla. Korteksi koostuu lähinnä kypsymättömistä tymosyyteista - kypsien T-solujen esiasteista - sekä korteksin epiteelisoluista (cortical thymic epithelial cell eli cTEC). Medulla sen sijaan koostuu pääosin makrofageista, jo kypsemmistä tymosyyteistä, dendriittisoluista ja B-soluista sekä medullan epiteelisoluista (mTEC) (1). Tymosyyttien kehittymiseen vaaditaan normaali tyymuksen rakenne, vastaavasti tyymuksen rakenne on riippuvainen kehittyviltä tymosyyteilta saaduista signaaleista (2).

Tyymuksen tärkein tehtävä on muodostaa T-soluja, joilla on toimiva T-solureseptori (T-cell receptor, TCR). Oikeanlaisen TCR:n avulla T-solut pystyvät erottamaan vieraat antigeenit elimistön omista, kun solut esittelevät antigeneja kudostyyppiantigeenijärjestelmällään (human leukocyte antigen, HLA). Esiastesolut saapuvat verestä tyymuksen kortikomedullariseen rajapintaan, josta ne lähtevät kehittymään korteksiin. Tässä vaiheessa näitä esiastesoluja aletaan kutsua tymosyyteiksi. Kehittyessään korteksissa tymosyytit läpikäyvät positiivisen selektion, jossa tarkistetaan, ovatko tymosyytit kykeneviä tunnistamaan omia HLA-pintaproteiineja. Matkalla medullaan tymosyyteista muodostuu erilliset CD4+ (T-auttaja) ja CD8+ (T-tappaja) solulinjat. (1, 2)

Jotta kypsät T-solut kykenevät tunnistamaan ja erottamaan vaurioituneet omat solut sekä elimistölle vieraat aineet kuten taudinaiheuttajat omien normaalisti toimivien solujen joukosta, täytyy omia kudoksia vastaan reagoivat tymosyytit karsia pois. Tapahtumasta käytetään nimitystä negatiivinen selektio, mikä on tärkein sentraalisen toleranssin komponentti. (1) Dendriittisolut (DC) ja mTEC:t tuottavat negatiivista selektiota varten elimistön omia kudasantigeneja, joita ne esittelevät HLA:ssa tymosyyteille. Autoimmuniregulaattori (*AIRE*) -geeni on kyseisen prosessin tärkeä transkriptiotekijä, koska se mahdollistaa mTEC-soluissa näiden kudasantigeenien tuotannon. (3) Ne tymosyytit, jotka reseptorillaan tunnistavat tarpeeksi voimakkaasti DC:en ja mTEC:en HLA:ssa esittelemiä antigeneja, tuhoutuvat. Jos omien kudasantigeenien esitleminen on puutteellista, verenkiertoon pääsee T-soluja, jotka tunnistavat joitakin kudasantigeneja haitallisina ja kohdistavat autoimmunireaktion kyseisiin kudoksiin. *AIRE*:n normaali ilmentyminen on siis ensiarvoisen tärkeätä. (1, 2)

## Käänteishyljintä

Hematopoeiettista kantasolusiirtoa (hematopoietic stem cell transplant eli HSCT) tarvitaan vakaviin verisolujen tai luuytimen syöpien hoitoon. Solusiirre voi olla allogeeninen eli peräisin saman lajin eri yksilöltä tai autologinen, jolloin kantasolut ovat kerätty potilaalta itseltään. Esimerkiksi leukemian, myelooman tai lymfooman hoitomenetelmiksi soveltuvat molemmat siirteet - allogeenista HSCT:tä käytetään kuitenkin useimmin viimeisenä optiona (4). Käänteishyljintäreaktio (Graft-versus-host disease eli GVHD) on allogeenisen hematopoeettisen kantasolusiirteen yleisin ja haastavin komplikaatio. Se jaetaan akuuttiin (aGVHD) ja krooniseen (cGVHD) muotoon. Merkittävää käänteishyljintää esiintyy noin joka toisella allo-HSCT potilaalla. (5)

## Akuutti käänteishyljintä

### Oireet ja esiintyvyys

Ensimmäisen 100 päivän sisällä siirteestä ilmenevää käänteishyljintää kutsutaan aGVHD:ksi. Se voi kuitenkin esiintyä myös 100 päivän jälkeen, tällöin puhutaan myöhäisestä aGVHD:sta. Lisäksi akuutin GVHD:n oireita voi ilmetä yhdessä kroonisen GVHD:n kanssa niin sanotussa limittäissyndroomassa. (2, 5, 6) Tyypillisin aGVHD:n kohde on iho, jonne muodostuu etenkin makulopapillaarista ihottumaa n. 80%:lle aGVHD-tapauksista (5). Kudostuhoa esiintyy myös mahasuolikanavassa, missä se voi ilmetä ripulina ja pahoinvointina, mutta myös oksenteluna, mahakipuna, ruokahaluttomuutena sekä verenvuotona. Kolmas tyypikohde on maksa, missä aGVHD aiheuttaa usein kolestaasia. aGVHD luokitellaankin sitä vakavammaksi, mitä laajemmalla se vaikuttaa ja mitä vakavampia oireita esiintyy. Mitä vakavampi käänteishyljintä on, sitä huonompi on todennäköisyys selvitä siitä (2).

### Patogeneesi

Akuutin käänteishyljintäreaktion muodostumiseen vaaditaan seuraavat kriteerit: siirre pitää sisällään luovuttajan immunokompetentteja soluja; potilaan ja luovuttajan immuunijärjestelmän solut eroavat; sekä potilas ei pysty muodostamaan immuunireaktiota luovuttajan soluja vastaan (2). Eroavaisuuksilla luovuttajan ja potilaan immuunisolujen välillä tarkoitetaan lähinnä eroja solujen HLA-pintaproteiinien välillä. Luovuttajan T-solut eli potilaalle allogeeniset T-solut tunnistavat potilaan kudasantigeenit vieraana kohteena ja voivat aiheuttaa sen myötä kudostuhoa.

Kun valmistaudutaan allo HSCT:on, on edeltävä esihoito toksinen, mikä voi vaurioittaa eri kudoksia. Esihoito voidaan toteuttaa esimerkiksi säteilytyksellä, kemoterapialla tai niiden yhdistelmällä. Myös siirteen taustalla oleva sairaus tai sen hoito on voinut vahingoittaa kudusrakenteita luoden perustan aGVHD:lle. Vaurion takia kudospaikalla ilmentyy tulehdusreaktiota vahvistavia sytokiineja, jotka aktivoivat antigeeneja esitteleviä soluja (antigen presenting cell eli APC), jotka puolestaan aktivoivat luovuttajalta peräisin olevia T-soluja. (2, 5) Aktivoiduttuaan immunokompetentit allogeeniset T-solut kohdistavat immuunireaktion potilaan usein jo vaurioituneisiin kudoksiin lisäten kudოსvauriota. Näin reaktioketjusta muodostuu oravanpyörä, koska potilaan omat immuunisolut eivät kykene tuhoamaan allogeenisia T-soluja.

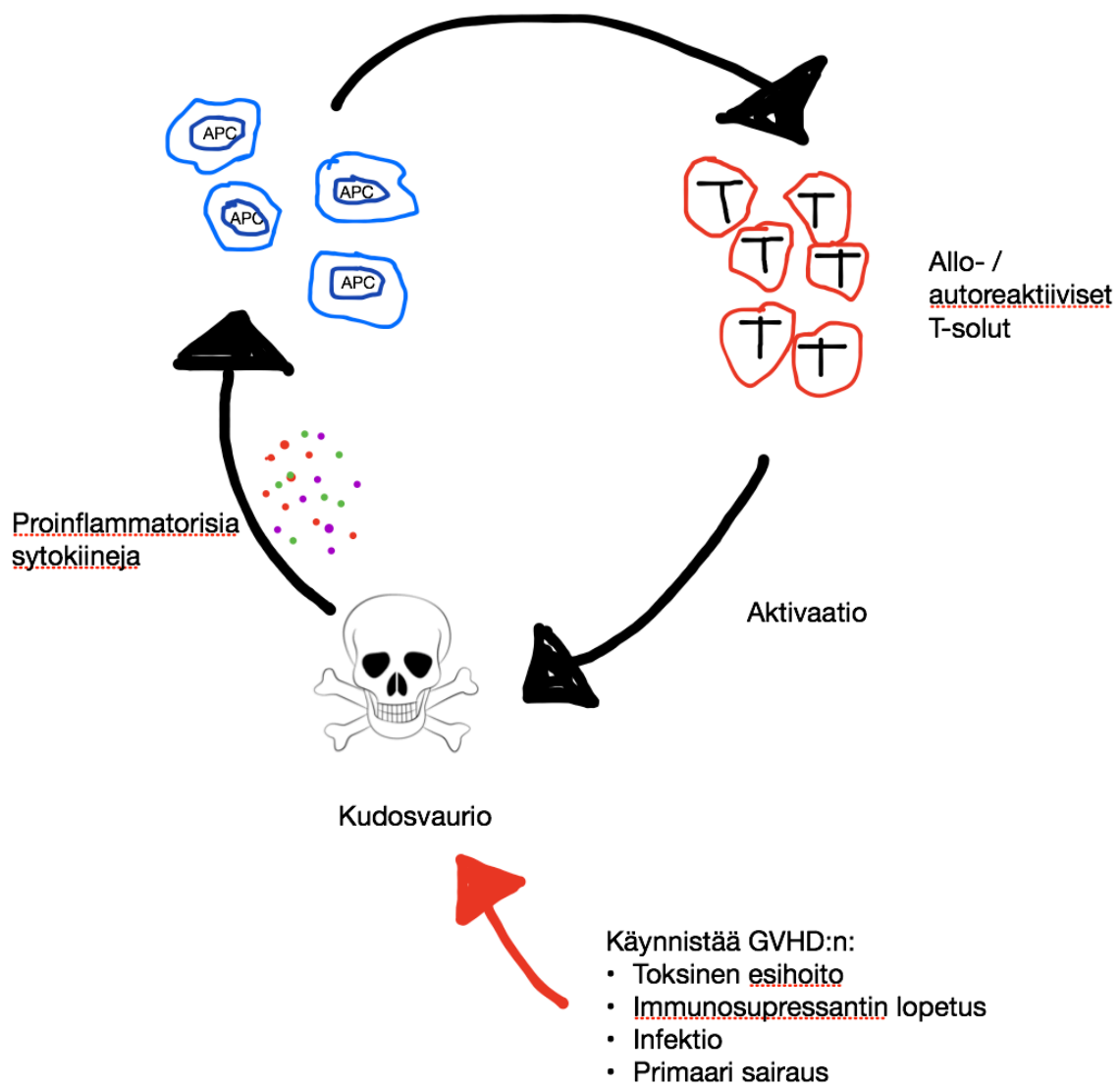
## Hoito

aGVHD:ta pyritään ensisijaisesti hoitamaan ehkäisemällä sen muodostuminen. Puhkeamiseen vaikuttaa etenkin HLA-vastaavuus luovuttajan ja vastaanottajan välillä. Vastaavuus on paras HLA-identtisillä sisaruksilla, mutta tällöinkin käänteishyljintää voi tapahtua johtuen muista immunologisista tunnisteista (nk. minor histocompatibility antigens). Pelkkä HLA-vastaavuus ei riitä, sillä käänteishyljinnän riskiä lisää myös ikä, esim. aikuisilla aGVHD:n riski on jopa 40%, vaikka kyseessä olisi HLA-identtinen luovuttaja (2, 5).

Akuutin GVHD:n immunologisesti kiinnostavin vauriopaikka ei ole mikään yllä mainituista kolmesta kohteesta – vaan kyseessä on tyymus. Tyymusvaurio vähentää T-solutuotantoa, sekä muokkaa muodostuvia naiiveja T-soluja autoreaktiivisempaan suuntaan.



Kuva 1: Käänteishyljintäreaktion muodostuminen, mukaillen Taskinen et al. 2017 (7)



## Akuutin GVHD:n vaikutukset tyymukseen

aGVHD vaurioittaa tyymusta. Selkeimpiä ovat histologiset muutokset: kortikomedullaarisen rajapinnan katoaminen ja tyymusatrofia (2). Tyymuksen rakenne on riippuvainen tymosyyteista, joten kun selektion läpikäymättömien tuplapositiivisten (DP) tymosyyttien määrä vähenee, heikkenee myös tyymus. DP-tymosyytit vähenevät kahdesta syystä. Ensinnäkin triplanegatiivisia eli tyymykseen saapuvia tymosyytteja ei tuoteta normaalisti. Syynä voi olla aGVHD:n vaikutukset luuytimen lymfoidisten esiastesolujen tuotantoon, jolloin tymosyytteja saapuu tyymukseen paljon vähemmän (8). Toiseksi DP-soluja tuhoutuu apoptoottisesti enemmän kuin normaalisti. (2)

aGVHD voi vaurioittaa suoraan TEC:a. TEC:t aktivoivat luovuttajan alloreaktiivisia T-soluja, jotka kykenevät IFN $\gamma$  tuotantoon. IFN $\gamma$  puolestaan käynnistää TEC-soluissa STAT1 välitteisesti apoptoosia (9). Mahdollisesti tämän takia medullaarisissa TEC:ssa AIRE:n tuotanto muuttuu, jolloin ektooppisten perifeeristen kudasantigeenien (tissue-restricted peripheral self-antigens, TRA) ilmentyminen häiriintyy. Seurauksena muodostuu tietyille TRA:lle spesifisiä autoreaktiivisia T-soluja, jotka pääsevät systeemiseen kiertoon tyymuksesta, jolloin ne voivat aiheuttaa kudonsvauriota periferiassa. (10)

Näiden lisäksi medullassa ilmentyy luovuttajan DC:a, joissa on siis eri HLA-tyypitys kuin potilaan omilla soluilla. HLA-eroavaisuus korteksin positiivisen selektion ja medullan negatiivisen selektion välillä, yhdistettynä TEC-määrän laskuun estää normaalia negatiivista selektiota mikä osaltaan aikaansaa autoreaktiivisten T-solujen vapautumista tyymuksesta verenkiertoon. (2)

## Krooninen käännteishyljintä

### Oireet ja esiintyvyys

cGVHD on perinteisesti määritelty käännteishyljintänä joka alkaa 100 päivän kuluttua HSCT:sta. cGVHD on oirekuvaltaan laajakirjoisempi kuin aGVHD, ja cGVHD:n diagnostisina oireina pidetään iho- ja silmäoireita, tukkeavaa bronkioliittia (bronchiolitis obliterans) sekä kynsien ja hiusten haurastumista. Iho-oireet voivat vaihdella punajäkälän kaltaisesta ihottumasta skleroosiin. (11) Useat eri limakalvot ovat myös cGVHD:n kohteena, ja alloimmunireaktio voikin kohdistua niin mahasuolikanavaan, kuin myös genitaalialueille. Mahasuolikanavan muutokset voivat johtaa ahtaumiin esimerkiksi jos ruokatorveen kehittyy verkkomaista sulkukalvoa. Se puolestaan voi aiheuttaa aGVHD:n tapaan aliravitsemusta nielemisen vaikeutuessa. (5) Kuten aiemmin mainittua, limittäissyndroomassa cGVHD:n oireita esiintyy yhdessä aGVHD:n kanssa. Tämä voi tapahtua ensimmäisen 100 päivän kuluessa siirteestä. (5, 6, 11) Jos primaarisairaus ei uusiudu, on cGVHD laaja-alaisen oireittensa takia nykyään allogeenisten HSCT-potilaiden yleisin kuolleisuuden aiheuttaja. (11)

## Patogeneesi

Lähtölaukauksena cGVHD:lle toimii kudosisvaurio. Tämä voi syntyä jo siirrettä edeltävästä esihoidosta, kuten aGVHD:ssa tai vasta myöhemmin. Esimerkiksi immunosuppressiolääkityksen lopetus tai infektio voi aikaansaada tulehdusreaktion, jonka seurauksena antigeeneja esittelevät solut aktivoituvat. Nämä puolestaan esittelevät potilaan omia antigeeneja alloreaktiivisille T-soluille, jolloin muodostuu saman tyyppinen kierre kuin aGVHD:ssa. (6) Kudoksia vaurioittavat solut voivat olla myös autoreaktiivisia, sillä usein cGVHD:ta edeltää aGVHD. Tyymus voi olla akuutin GVHD:n jäljiltä vaurioitunut ja tuottaa omien T-solujen lisäksi myös jonkin verran autoreaktiivisia naiiveja T-soluja, jotka hyökkäävät omia kudoksia vastaan, kun APC:t esittelevät niille omia kudosisantigeeneja. (2, 11) Jos aGVHD:n tyymusvauriota saadaan vähennettyä, on tyymus toimintakykyisempi ja tuottaa enemmän normaaleja T-soluja, mikä puolestaan lievittää cGVHD:ta. (11)

cGVHD:n patogeneesi on osin vielä tuntematon eikä T-solujen roolia täysin tunneta. Kuitenkin tiedetään, että cGVHD:on liittyy myös epänormaalia B-solujen toimintaa. Allo- ja autoreaktiiviset T-solut vaikuttavat B-solujen epätyypilliseen toimintaan, mikä puolestaan voisi johtaa epänormaaliin vasta-ainetuotantoon. Autovasta-aineet voivat tällaisissa tapauksissa lisätä kudostuhhoa kohdepaikalla. (6, 11) On myös mahdollista, että B-solujen epänormaali käyttäytyminen johtuisi eri HLA-molekyyleistä luovuttajan ja saajan välillä, jolloin vasta-aineita voi niin ikään muodostua omia kudoksia kohtaan. (6) cGVHD-potilailla on lisäksi havaittu poikkeuksellisen korkeita määriä B-soluja aktivoivaa faktoria (B-cell-activating factor, BAFF). Korkeiden BAFF-tasojen uskotaan mahdollistavan autoreaktiivisten B-solujen selviämistä vaikka nämä normaaleilla BAFF-pitoisuuksilla tuhoutuisivat. Kasvaneen BAFF-määrän aiheuttajaa ei tiedetä. (11)

Kroonista kääntheishyljintäreaktiota sairastavilla on myös havaittu olevan vähemmän säätelijä T-soluja (regulatory T-cell, T-reg). Lisäksi on havaittu, että siirteen allo T-reg määrä korreloi kääntheisesti aGVHD:n vakavuuteen. (11) T-reg:t vastaavat periferisestä toleranssista ja supresseivät immuunivastetta niin sytokiinivälitteisesti kuin vähentämällä T-solun kontaktia APC:n kanssa sitoutumalla itse APC:n (12). Heikentynyt immuunijärjestelmän jarru voi mahdollistaa niin autoreaktiivisten T- ja sitä kautta myös autoreaktiivisten B-solujen toiminnan (6). T-reg:n vähäisestä määrästä ei olla varmoja: syyksi on epäilty tyymuksen heikentynyttä toimintaa sekä T-reg:n vähentynyttä jakautumiskykyä ja lisääntynyttä apoptoosia (11).

## Hoito

Kroonista kääntheishyljintää yritetään pitää kurissa immunosuppressiolla esimerkiksi steroidien avulla. Paikallisiin cGVHD:n oireisiin tämä voikin toimia. (5) cGVHD:n hoito on kuitenkin tällä hetkellä suurilta osin tehotonta. Paras tapa onkin ehkäistä

taudin puhkeamista. Koska tyymusvaurio altistaa niin autoreaktiivisten T-solujen muodostumiselle, kuin vähäiselle T-reg määrälle, on ensiarvoisen tärkeätä pyrkiä välttämään vauriota aiheuttavaa aGVHD:ta. (11) Myös siirteellä on väliä. Mitä vähemmän alloreaktiivisia T-soluja sekä enemmän T-reg:ja siirteessä on, sitä epätodennäköisemmin cGVHD puhkeaa. Tosin siirteen vähäinen naiivien T-solujen (eli T-solujen, jotka eivät ole vielä kohdannut vastinantigeeniaan) määrä altistaa primaarisairauden uudelleen puhkeamiselle, joten siirteen koostumuksessa on tehtävä kompromisseja. (12) Siirteen moduloiminen saattaa tarjota mahdollisuuksia ehkäistä käännteishyljintää. T-reg:n määrän lisääminen ja B-solujen määrän vähentäminen ovat todennäköisiä keinoja vähentää niin a- kuin cGVHD:ta. (5, 11, 12)

## APECED

### Oireet ja esiintyvyys

Autoimmuunipolyendokrinopatia-kandidaasi-ektodermidystrofia eli yleisimmin APECED (tunnetaan myös nimellä autoimmuuni-polyendokrinopatia syndrooma tyyppi 1 eli APS1) on harvinainen autoimmuunisairaus, mutta yleisempi tietyillä väestöryhmillä, kuten Iranin juutalaisilla (prevalenssi 1:9000) (13), sardinialaisilla (1:14000) (14) ja suomalaisilla (1:25000) (15). Yleisimpiä oireita ovat krooninen mukokutaaninen kandidaasi (CMC), jota usein seuraa hypoparatyroidismi sekä Addisonin tauti. Muita yleisiä endokrinopatioita ovat hypergonadotrooppinen hypogonadismi, tyypin 1 diabetes ja kilpirauhasen vajaatoimintaan johtava autoimmuunitulehdus. Tautiin kuuluvat lisäksi mahasuolikanavan affisiot, kuten ripuli ja pernizioosi anemia ja hepatiitti, mutta myös ektodermaaliset oireet, joista yleisimpiä ovat ihoreaktiot, keratokonjunktiviitti ja kynsien dystrofia. APECED on autosomaalisesti resessiivisesti periytyvä suomalaisen tautiperimän sairaus, jonka aiheuttaa *AIRE*-geenin homotsygoottinen mutaatio. Epäily APECED:sta on usein kliininen ja diagnoosi vahvistetaan *AIRE*-geenin sekvesoinnilla. (16)

### Patogeneesi

*AIRE*:lla on merkittävä rooli negatiivisessa selektiossa, sillä se vastaa muiden kudosten antigeenien esittelystä T-soluille. APECED-potilailla toimimattoman *AIRE*:n seurauksena negatiivinen selektio ei toimi kunnolla ja muodostuu normaalien T-solujen lisäksi autoreaktiivisia T-soluja, jotka aiheuttavat laajan autoimmuunireaktion. Autoimmuunireaktion syntymekanismeissa on täten yhtäläisyyksiä aGVHD:n tyymusvaurion aiheuttamaan autoreaktiivisten T-solujen muodostumiseen. (16)

APECED-potilailla on havaittu merkittäviä määriä antisytokiinityyppejä autovasta-aineita (anti-cytokine autoantibodies, aCA). Potilailla on autovasta-aineita esimerkiksi IL-17A:ta ja IL-22:ta vastaan, jotka estävät normaalisti kyseisten interleukiinien kautta välittyvää synnynnäisen immuunijärjestelmän antimikrobiaalista puolustusta aiheuttaen näin kandidaasia. IL-17A aCA:n

pitoisuuden on ajateltu olevan suoraan verrannollinen kandidaasin vakavuuteen. Toisin kuin muut APECED:n komponentit, kandidaasia pidetäänkin immuunipuutostautina, ei autoimmuunitautina. (16-18) Näillä potilailla aCA:t neutraloivat myös IFN $\alpha$ :a, mikä voi aiheuttaa Th17-solujen erilaistumisen vaimentumista, jotka normaaleina suojaavat Candida-infektioilta. (16)

## Antisytokiini autovasta-aineet

Suurimalla osalla väestöstä on jonkin verran autovasta-aineita, eikä niiden merkityksestä tiedetä juurikaan (19). Antisytokiiniset autovasta-aineet ovat autovasta-aineiden alatyyppejä, ja ne voivat olla neutraloivia tai ei-neutraloivia. Ne vaikuttavat estämällä vastinsytokiininsa vaikutuksia – neutraloivat aCA:t vaikuttavat voimakkaammin, sillä ne kykenevät myös estämään vastinsytokiinin sitoutumista reseptoriinsa. Seurauksena aCA:t voivat suurina määrinä merkittävästi heikentää vastinsytokiininsa vaikutuksia ja täten esimerkiksi muuttaa normaalia immunologista vastetta. aCA:t ovat lähinnä IgG-luokkaa. (19)

## Normaaliväestössä

aCA:ta tavataan niin terveillä, kuin sairailta ihmisillä, tosin terveillä lähinnä vähäisiä määriä. Terveillä aCA:n ajatellaan säätelevän sytokiinien homeostaasia. Esiintyminen onkin satunnaisempaa kuin sairailta ja siihen voi vaikuttaa viimeisimmät infektiot. Lisäksi aCA:a on havaittu enemmän miehillä sekä iäkkäillä. (18) Interferoneita kohtaan muodostuvista aCA:sta yleisimpiä ovat tyyppi I:n  $\alpha$  ja  $\omega$ , joita esiintyy n. 2%:lla terveestä väestöstä. (19) Interferonit ovat sytokiineihin kuuluvia immuunijärjestelmän vaikutuksia välittäviä proteiineja. On raportoitu, että aCA:a voisi olla enemmän, mutta ne muodostaisivat immuunikomplekseja sytokiinien kanssa, minkä takia niitä ei havaita useillakaan määritysmenetelmillä. Kyseisten immuunikompleksien merkitys ei ole kuitenkaan vielä selvillä (20). Eri lähteiden mukaan yleisin immuunikompleksi olisi IL-1 $\alpha$  ja sen vasta-aine, anti IL-1 $\alpha$ , jota esiintyy n 5-25%:lla terveistä yksilöistä. (19)

## Sairauksissa

Korkeita aCA-tasoja esiintyy etenkin APECED:ssa ja tymoomissa. Tymooma on tyymuksen epiteelisolujen kasvain, johon voi liittyä autoimmuunitauti myastenia gravis (MG). Tymoomia raportoidaan useimmin vasta yli 40-vuotiailla. Molemmille sairauksille yhteistä onkin epänormaali negatiivinen selektio. APECED:ssa ongelmana siis on *AIRE*-geenin mutaatiosta seuraava antigeenien liian vähäinen esittely, ja tymoomassa puolestaan *AIRE*:n ekspressio on poikkeavaa ilman geenivirhettä. Häiriintynyt negatiivinen selektio altistaa autoreaktiivisten T-solujen muodostumiselle. Sekä APECED:ssa, että tymoomassa muodostuu eniten juuri vasta-aineita IFN- $\alpha$ 2 ja  $\omega$ :aa kohtaan. APECED-potilailla kyseisten anti-

interferonien esiintyvyys on 98% ja 100%, tymoomassa vastaavat luvut ovat 70% ja 60%. Eroavaisuuksiakin löytyy: APECED-potilaista n. 40% tuottaa anti IL-17A:ta ja 90% anti IL22:ta, kun taas tymoomassa esiintyvyys molemmissa on alle 5%. Kuten edellä todettiin, nämä interleukiinit liittyvät kandidaasin esiintyvyyteen, mikä mahdollisesti selittää miksi kandidaasia on enemmän APECED-potilailla kuin tymoomapotilailla. Niillä tymoomapotilailla, joilla ei ollut kandidaasia, ei myöskään ollut yhtään anti IL17- tai -IL22:ta. Toisaalta heillä, joilla oli kandidaasia, löytyi myös kyseisiä aCA:ta. Tämä vahvistaa IL-17- ja IL-22:n suojaavaa roolia kandidaasia vastaan. (16, 21) aCA:n tarkempi esiintyvyys sairauksittain esitetään taulukossa 1. (19)

Pelkästään näissä kahdessa sairaudessa autovasta-aineiden kliininen merkitys yleisesti on epäselvä, puhumattakaan monesta muusta sairaudesta, kuten kroonisesta polyartriitista ja reumaattisesta sydänsairaudesta, joissa aCA esiintyvyys on lähinnä satunnaista (19). APECED:ssa autovasta-aineita voi muodostua jo vauvaiässä, mutta myöhemmin pitoisuudet eivät välttämättä korreloi ikään. Autovasta-aineiden pitoisuuksilla voidaan ennustaa APECED:n etenemistä, mikä lisää pohdintaa autovasta-aineiden varsinaisesta syntymekanismista ja merkityksestä. (16)

#### Antisytokiini autovasta-aineiden muodostuminen

Vallitsevan teorian mukaan APECED:ssa aCA:a muodostuu kun autoreaktiivisia T-soluja vapautuu tyymuksesta. B-solujen vasta-ainetuotanto on T-soluista riippuvaista, sillä itukeskuksissa kehittyvät B-solut tarvitsevat T-soluilta signaaleja vasta-ainetuotannon somaattisiin hypermutaatioihin ja luokanvaihtoon (1). Teorian mukaan autoreaktiiviset T-solut ohjaavat kypsyviä B-soluja tuottamaan vasta-aineita niin ikään omia antigeeneja vastaan (16, 17, 19, 22). Toisaalta APECED:n kliinisten oireiden ja löydösten esiintyminen vaihtelee merkittävästi, vaikka lähes kaikilla potilailla on interferoni-vasta-aineita. Suomalaisen aineiston mukaan tauti manifestoituu 0,2 – 18 vuoden iässä ja aCA:t ovat usein ensimmäisiä merkkejä taudista (15, 16).

Toistaiseksi aCA:n muodostumisesta on vain teorioita ja autovasta-aineiden sekä autoimmunireaktion muodostuminen vaatii yleisesti lisätutkimusta. Esimerkiksi kun yhtälöön lisätään, että APECED-potilailla ei ole hirveästi enemmän yleisimpiä virusinfektioita kuin muillakaan, vaikka IFN- $\alpha$  ja - $\omega$  välitteisen viestinnän olettaisi olevan vaillinaista, koska IFN- $\alpha$ :aa tarvitaan viruspuolustuksen alkuvaiheessa. IFN- $\beta$  voi kuitenkin toimia aktiivisempänä tekijänä näiden kahden interferonin puutoksia ja käynnistää viruspuolustusta. (19) Toisaalta APECED-potilailla on korkeammat vasta-ainetasot sytomegalovirusinfektioissa kuin muuten terveillä (I. Hetemäki, julkaisematon havainto). Tämä viittaa jonkinlaiseen häiriöön vasta-ainetuotannossa ja viruspuolustuksessa.

*Taulukko 1: aCA:t sairauksissa*

Sairaus	aCA-tyyppi	Esiintyminen
APECED	IFN- $\alpha$ / $\omega$	90-100
	IFN- $\beta$	30
	IFN- $\gamma$	<5
	IFN- $\lambda$	10-20
	IL-17A	41
	IL17F	75
	IL-22	91
Myastenia gravis tymooman kanssa	IFN- $\alpha$ / $\omega$	60-70
	IFN- $\beta$	8
	IFN- $\lambda$	<5
	IL-12	52
	IL-17A	<5
	IL17F	<5
	IL-22	<5
Tymooma ilman myastenia gravista	IFN- $\alpha$ / $\omega$	30-40
	IFN- $\beta$	<5
	IFN- $\lambda$	<5
	IL-12	18-24
Systeeminen lupus erythematosus	IFN- $\alpha$ / $\omega$	10-30
	IFN- $\lambda$	17
Reumaattiset sairaudet: reumaattinen artriitti, systeeminen skleroosi	IL-1 $\alpha$	10-30
	IL-4	<5
	IL-10	<5

## TAVOITTEET

Tietämyksemme käänteishyljintäreaktiosta, sekä autoimmuunitaudeista yleisesti on kasvanut viime vuosikymmeninä merkittävästi. Silti useat perustavat vaiheet ovat vielä tuntemattomia:

1. miten autoreaktiiviset T-solut muodostuvat GVHD:ssa
2. mikä on antisytokiini autovasta-aineiden (aCA) rooli sairauksissa

Syventävän tutkielman hypoteesini mukaan cGVHD:ssa vapautuvat autoreaktiiviset T-solut vaikuttavat B-solujen kehitykseen ja aCA-tuotantoon, jolloin cGVHD-potilaiden verestä löytyisi aCA:ta. Mikäli aCA:ta löytyy tutkittavien potilaiden näytteistä, voidaan tutkimusta jatkossa syventää ja selvittää näiden aCA:en merkitystä cGVHD:ssa. Tämä voi osaltaan tarjota tietoa aCA:en roolista autoimmuunitaudeissa sekä cGVHD:n patogeneesistä yleisesti.

## MATERIAALI JA MENETELMÄT

### Tutkimusmenetelmät

Seerumin anti-IFN- $\alpha$  2a vasta-ainetaso määritettiin entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä eli ns. ELISA-menetelmällä. Ensin kuoppalevyn pohjaan kiinnitetään antigeenia (IFN- $\alpha$  2a). Ylimäärä huuhdotaan pois, jolloin vain pohjaan kiinnittyneet antigeenimolekyylit jäävät kuoppaan. Tämän jälkeen kuoppaan pipetoidaan tutkittavan seerumia, joka on laimennettu haluttuun suhteeseen. Jos seerumi sisältää autovasta-ainetta, sitoutuu se interferoniin eli antigeeniin. Seuraavaksi lisätään sekundaarivasta-aine, johon on liitetty alkalinen fosfataasi-entsyymi. Sekundaarivasta-aine sitoutuu ihmisen IgG-luokan vasta-aineiden Fc-osaan. Lopulta kuoppaan laitetaan entsyymien substraattia, joka sitoutuu sekundaarivasta-aineeseen liitettyyn entsyymiin muodostaen kemiallisen reaktion, joka voidaan havaita värimuutoksena paljaallakin silmällä, mutta joka kvantitoidaan spektrofotometrillä kun reaktio on ensin pysäytetty. Spektrofotometri mittaa kuinka paljon entsyymi-substraattiliuos absorboi valoa. Absorbanssi riippuu aineen ominaisuuksista (absorptiokerroin), näytteen paksuudesta sekä absorboivan aineen konsentraatiosta. Viimeksi mainitun ollessa käytännössä ainoa muuttuja, saadaan eri näytteiden vasta-ainepitoisuuksien suhde helposti selville.



## Potilasaineisto

Tutkimuksen aineistona käytettiin allogeenisen HSCT:n saaneiden potilaiden seerumia. Tutkimusaineistossa oli seeruminäytteet 20 potilaasta, joista miehiä oli kahdeksan ja naisia 12. Potilaista 90%:lla (18/20) oli cGVHD. cGVHD-potilaiden oireet vaihtelivat niin vakavuudeltaan kuin tyypiltään: kuudella oireet olivat ei-skleroderma -tyyppisiä, yhdeksällä oireet muistuttivat sklerodermaa, yhdellä oli Sjögrenin oirekuvaa muistuttavia oireita ja kahdella oireet rajoittuivat iholle, suuhun ja silmiin. Puolet cGVHD-potilaista sai hoitoa oireisiinsa näytteiden ottohetkellä. Perussairaus, oireet, profylaksia sekä hoidot on kuvattu taulukossa 2. Tutkimukseen käytetyllä aineistolla oli eettisen toimikunnan lupa (TO5/013/16).

Potilasnäytteiden lisäksi mukana oli standardinäyte ja kontrollit. Standardi- eli ns. vakionäytteenä oli aiemmin määritettyä potilasseerumia, jonka IFN-alfa 2a autovasta-ainepitoisuus tiedetään. Standardeista tehtiin neljä eri laimennosta ihmisen seerumialbumiinipuskuriin (human serum albumin, HSA): 1:50, 1:150, 1:450 ja 1:1350. Näiden avulla muodostetaan standardikäyrä analyysivaiheessa. Jos potilasnäytteet sisälsivät IFN-alfa 2a aCA:ta, määritettiin pitoisuus suhteuttamalla näytteen absorbanssi standardien absorbanssikäyrälle. Positiiviset kontrollit ja negatiivinen kontrolli olivat mukana laaduntarkkailun takia. Positiivisina kontrolleina käytettiin tunnettua APECED-potilasta sekä *IKZF2*-geenin mutaation omaavaa potilasta. Molemmista potilaista tiedettiin IFN-alfa 2a aCA-pitoisuudet.

## Reagenssit

- Interferoni alfa-a2 (Roche, Roferon-A), erä B3041B08,  $6 \cdot 10^6$  IU/ml
  - o 1mg IFN =  $270 \cdot 10^6$  IU
  - o 1µg IFN vastaa 45µl Roferon-A:ta
  - o käyttölaimennoksessa c(IFNalfa-a2) = 2µg/ml PBS
- Pesupuskuri: 0,05% Tweenia PBS:ssä
- HSA-puskuri, jossa 3% HSA:ta PBS:ssä
  - o HSA (Human serum albumin) 200g/l, erä 16I25HI62B
  - o PBS-puskuri
- Inhibitiopuskuri
  - o suhde: (antigeenin käyttölaimennos : HSA20% : PBS) = (2 : 1,2 : 4,8)
- IgG – konjugaatti, entsyyminä anti-humaani alkalaani fosfataasi
- Substraatti: 4-NPP eli 4-nitrofenyyli fosfaatti (20mg/ml)
  - o Käyttölaimennos 2mg/ml dietanolamiiniliuokseen
- Pysäytysliuos 1M NaOH

*Taulukko 2: Potilasaineiston tiedot – Lyhenteet sairauksille: MM = multippeli myelooma, AML = akuutti myeloinen myelooma, KLL = krooninen lymfaattinen leukemia, NHL = non-Hodgkinin lymfooma, MDS = myelodysplastinen oireyhtymä. Lyhenteet lääkkeille: ATG = antitymosyytti globuliini, S = siklosporiini, MTX = metotreksaatti, T = takrolimuusi, MMF = mykofenolihappo, E = everolimuusi, P = metyyliprednisoloni*

Hoidon aloituspäivä	Näytteiden ottopäivä	Sukupuoli	Ikä	Diagnoosi	krooninen GVHD	Profylaksia	Lääkitys
18.9.2015	21.4.2016	M	66	MM	Ei	ATG+S+MTX	Ei
4.12.2015	9.5.2016	M	31	AML	Ei	ATG+T+MMF+MTX	Ei
3.5.2016	21.6.2016	N	64	MM	ei-skleroderma -tyyppinen	ATG+T+MTX	T
11.7.2014	13.4.2016	M	54	AML	ei-skleroderma -tyyppinen iholla	ATG+E+MMF+MTX	Ei
6.10.2015	31.3.2016	N	54	AML	ei-skleroderma -tyyppinen ruoansulatuskanavassa	ATG+T+MMF	E+P+MMF
20.2.2015	9.5.2016	M	63	KLL+NHL	ei-skleroderma -tyyppinen iholla ja maksassa	ATG+T+MMF+MTX	MMF+E+P
15.8.2012	21.4.2016	M	66	MDS	ei-skleroderma -tyyppinen iholla, maksassa, silmissä ja suussa	ATG+S+MTX	Ei
10.11.2015	9.5.2016	N	39	NHL	ei-skleroderma -tyyppinen lievänä iholla	ATG+T+MMF+MTX	Ei
3.8.2012	30.3.2016	M	54	NHL	skleroderma	ATG+S	MMF+P
5.9.2014	7.3.2016	N	44	AML	Skleroderma -tyyppinen	ATG+E+MTX	MMF+E+P
11.2.2015	19.8.2016	N	56	MM	Skleroderma -tyyppinen	ATG+E+MMF+MTX	E+MMF
16.5.2014	31.8.2016	N	24	ALL	Skleroderma -tyyppinen	ATG+S+MTX	MMF
8.6.2013	30.6.2016		48	MM	Skleroderma -tyyppinen	ATG+S+MTX	MMF
20.4.2012	13.4.2016	N	46	MM	Skleroderma -tyyppinen maksassa ja limakalvoissa	T+MTX	Ei
5.9.2014	13.4.2016	N	57	MM	skleroderma -tyyppinen iholla, maksassa ja suussa	ATG+E+MMF+MTX	Ei
16.5.2015	2.3.2016	N	65	AML	skleroderma -tyyppinen maksassa ja silmissä	ATG+T+MMF+MTX	Ei
28.2.2014	27.6.2016	M	54	ALL	skleroderma -tyyppinen keuhkoissa, endokriinirauhasissa, silmissä ja suussa	ATG+S+MTX	E+MMF
18.5.2013	28.4.2016	N	58	Myelofibroosi	Sjögrenin oirekuva muistuttava	ATG+S+MTX	Ei
9.4.2014	13.4.2016	N	66	MDS	lievänä iholla ja silmissä	E+MMF	Ei
29.4.2016	14.7.2016	M	54	MM	lievänä iholla, silmissä ja suussa	ATG+T+MMF+MTX	Ei

## Työn kulku

### 1. Päivä

- a. Kuoppalevyt päällystetään antigeenin käyttölaimennoksella 75µl/kuoppa, peitetään muovitarralla ja laitetaan jääkaappiin inkuboitumaan yön yli.
- b. Tehdään näytteistä, standardeista ja kontroleista laimennokset oheisen laimennostaulukon (taulukko 3) mukaisesti ja inkuboidaan laimennoksia yön yli jääkaapissa.

*Taulukko 3: Näytelaimennokset*

Näyte	HSA-puskuri (µl)	Inhibitiopuskuri(µl)	Suhde
Standardi-1	490 + 10	-	1:50
Standardi-2	200 + 100 edellistä	-	1:150
Standardi-3	200 + 100 edellistä	-	1:450
Standardi-4	200 + 100 edellistä	-	1:1350
IKZF2	490 + 10	490 + 10	1:50
APECED (apulaimennos)	490 + 10	490 + 10	1:50
APECED	300 + 100 edellistä	300 + 100 edellistä	1:200
Negatiivinen kontr.	490 + 10	-	1:50
Potilasnäytteet	490 + 10	490 + 10	1:50
Potilasnäytteet	300 + 100 edellistä	300 + 100 edellistä	1:200

### 2. Päivä

- a. Tehdään ns. blokkaukset, jolla estetään antigeenin epäspesifi sitoutuminen kuopan seinämiin. Ensin pestään pesupuskurilla 4 \* 300µl/kuoppa. Tämän jälkeen pipetoidaan HSA-puskuria 100µl/kuoppa. Inkuboidaan 1h ravistelijalla huoneenlämmössä.
- b. Pestään pesupuskurilla kuten edellisessä vaiheessa. Pipetoidaan näytteiden, standardien ja kontrollien laimennokset kuoppiin pipetointikartan mukaisesti 50µl/kuoppa. Inkuboidaan 2h ravistelijalla.
- c. Pestään kuopat kuten edellä. Laimennetaan konjugaatti HSA-puskuriin 1:5000, pipetoidaan laimennosta 50µl/kuoppa. Inkuboidaan ravistelijalla 1h.

- d. Pestään kuopat kuten edellä. Pipetoidaan substraatin käyttöalaimennosta 50µl/kuoppa. Inkuboidaan ravistelijalla 20min.
- e. Pysäytetään reaktio 1M NaOH:lla 50µl/kuoppa. Mitataan absorbanssi iEMS-spektrofotometrillä aallonpituudella 405nm.

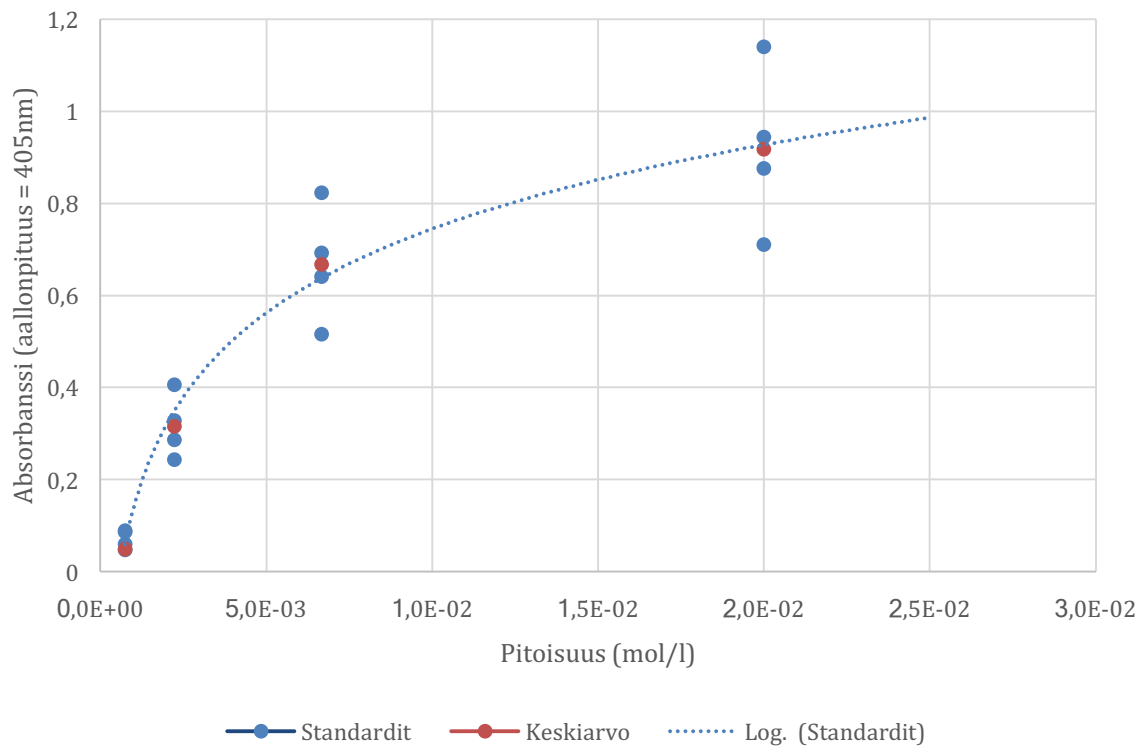
Määritykset tehtiin neljällä erillisellä pipetointikerralla, jotta saatiin kaikki 20 potilasnäytettä analysoitua. Ensimmäinen työ tehtiin kahdella potilasnäytteellä, loput työt tehtiin kuudella potilasnäytteellä laadun ja kokemuksen parantuessa. Kaikilla kerroilla mukana ELISA-testissä oli siis lisäksi standardi- ja kontrollinäytteet laadun tarkkailun ja näytteiden vasta-ainemäärän kvantitoinnin vuoksi.

## TULOKSET

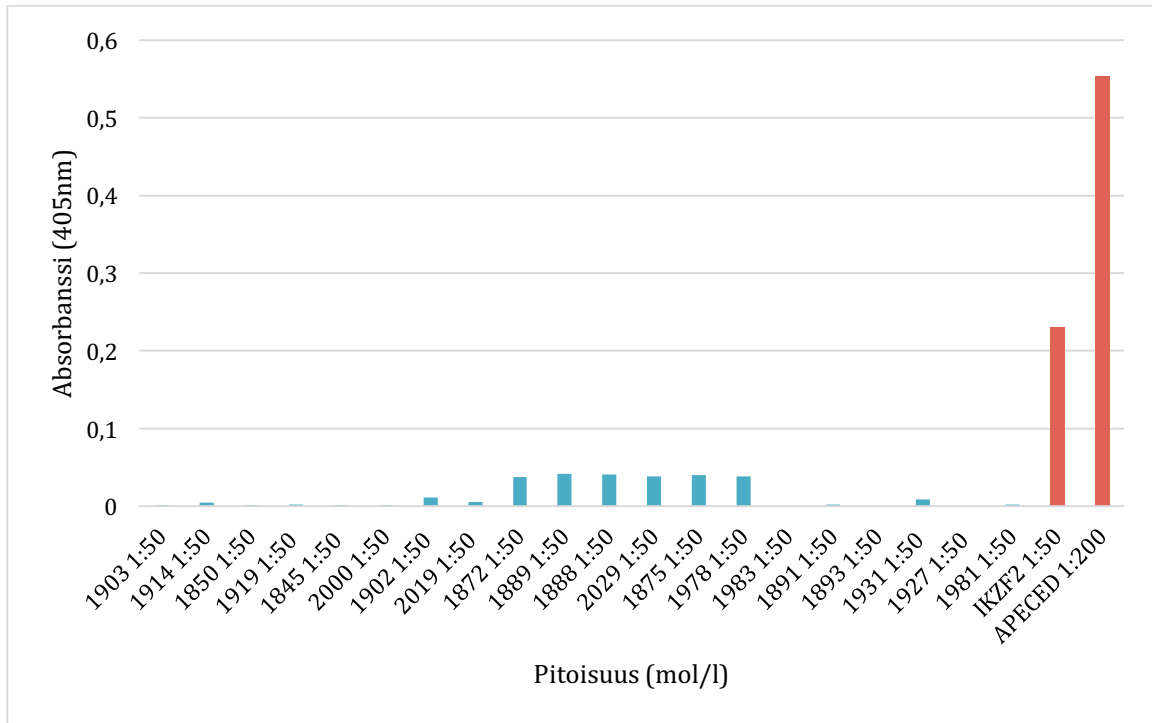
Kaikki tutkittavat potilasnäytteet osoittautuivat iEMS-spektrofotometrillä tehdyssä analyysissä IFN- $\alpha$  2a aCA:n osalta negatiivisiksi (kuva 2). Potilasnäytteiden absorbanssissa ei ollut eroa riippumatta siitä, oliko näyte HSA- vai inhibitiopuskurissa. Kun absorbanssiarvosta vähennettiin tyhjän kaivon absorbanssi, oli osa näytteistä absorbanssiltaan iEMS-spektrofotometrin mukaan jopa negatiivisia. Kuitenkin positiiviset kontrollinäytteet toimivat joka analyysikerralla erottuen selkeästi positiivisina potilasnäytteiden absorbanssitasosta. Lisäksi standardinäytteiden absorbanssi korreloi laimennokseen, ja näiden absorbanssiarvot asettuivat standardikäyrälle loogisesti (kuva 3).

Potilasnäytteet tutkittiin vielä uudestaan lusiferaasi immuunisaostusjärjestelmällä eli LIPS-tekniikalla Tarton yliopiston biolääketieteen instituutissa yhteistyökumppani professori Pärt Petersonin laboratoriossa. Sielläkin tulokset olivat niin ikään negatiiviset IFN- $\alpha$  2a aCA:n osalta. Samalla he myös analysoivat näytteistä IFN- $\Omega$  -, IL-6 -, IL-12 - ja IL-22 autovasta-aineet. LIPS-analyysi osoittautui muuten negatiiviseksi, mutta kahdella potilaalla oli IFN- $\Omega$  aCA:ta. Toinen potilasnäyte oli vain hieman positiivinen, mutta toinen oli selkeästi positiivinen. Nämä IFN- $\Omega$  aCA löydökset vaativat lisäselvittelyjä. Kuitenkin lisätulokset IFN- $\alpha$  2a aCA:n osalta vahvistavat omia tuloksiamme.

Kuva 2: **Näytteet** – Kontrollit (IKZF2 & APECED) erottuvat absorbanssiltaan kuvassa selkeästi positiivisina verrattuna potilasnäytteisiin.



Kuva 3: **Standardikäyrä** – potilasnäytteet ovat kuvassa sinisellä värillä ja kontrollit (IKZF2 ja APECED) ovat punaisella



## POHDINTA

Kroonisen kääntheishyljintäreaktion alkuvaiheessa autoimmuunireaktio muodostuu alloreaktiivisten T-solujen ajaman oravanpyörän ympärille. DC:t esittelevät kudsvaurion seurauksena antigeeneja allo T-soluille, jotka lisäävät kudsvaurioita. Kuten aiemmin todettua, kyseiset vauriot kohdistuvat myös tyymukseen, jonka seurauksena elimistö alkaa lopulta tuottamaan omia autoreaktiivisia T-soluja. Elimistön tuottamat autoreaktiiviset T-solut ovat alkuperältään siirteen mukana tulleita luovuttajan kantasoluista valikoituneita soluja. Seurauksena on, että elimistössä on kahden tyyppisiä ensisijaisesti kudsvaurioita aiheuttavia T-soluja: allo- ja autoreaktiivisia T-soluja. Onkin hieman epäselvää, kumpaa nimitystä pitäisi käyttää. Alkuvaiheessa tilanne lienee selvä kun alloreaktiiviset T-solut vastaavat kudostuhosta, mutta taudin edetessä pidemmälle, ei ole selvää kumpi solujoukko aiheuttaa enemmän tuhoa. cGVHD potilaiden kudsvauriota aiheuttavien T-solujen sekvenointi varmasti selvittäisi kumpi alaluokka on potilaalle vaarallisempi sekä voisi selventää nomenklatuuria.

Tutkimuksemme cGVHD-potilailta ei löytynyt IFN- $\alpha$  2 autovasta-aineita. Kuitenkin kahdella potilaalla eli 10%:lla olivat IFN- $\Omega$  aCA:t koholla: toisella varsin vähän, mutta toisella selkeämmin. Alhaisemmat IFN- $\Omega$  aCA pitoisuuden omannut potilas sai laskimonsisäistä immunoglobuliinihoitoa (IVIg, Nanogam) näytteenottohetkellä. IVIg valmisteet ovat peräisin yli 3000 verenluovuttajan plasmasta, ja niiden tiedetään pitävän sisällään pieniä määriä autovasta-aineita, joten ne voivat selittää alhaiset IFN- $\Omega$  pitoisuudet (23). Toisella potilaalla oli kuitenkin huomattavasti korkeammat IFN- $\Omega$  aCA pitoisuudet, eikä hän saanut IVIg-hoitoa. Potilas kärsi primaarisairautena myelodysplastisesta syndroomasta (MDS), mutta emme tiedä aiheuttaako se aCA:ta. Kantasolusiirteen jälkeen potilas on kärsinyt lähinnä lievestä cGVHD:n iho-oireista, jotka olivat suussa ja silmissä. Toisin sanoen tietääksemme potilaalla ei ole merkittäviä eroja muihin aineistomme potilaisiin, mikä voisi selittää IFN- $\Omega$  aCA:t. Tietenkin yksilölliset erot voivat hyvin olla myötävaikuttamassa autosytokiinien syntymiseen.

Riippumatta yhden potilaan korkeista IFN- $\Omega$  aCA:sta, tutkimuksemme mukaan cGVHD-potilailla ei ole aCA:a samoissa määrissä kuin APECED:ssa tai tymoomassa. Luultavasti tämä johtuu erilaisesta patogeneesistä sairauksien välillä. aCA:n syntymekanismi on kuitenkin edelleen epäselvä. Tiedetään, että normaali vasta-ainetuotanto vaatii B-solujen normaalin affiniteettimaturaation, mikä puolestaan tarvitsee signaaleja T-soluilta. Nykykäsityksen mukaan autoreaktiiviset T-solut aikaansaavat B-soluja tuottamaan myös autovasta-aineita (22). APECED:n ja cGVHD:n autoreaktiivisten T-solujen muodostuminen onkin erilaista ja tämä voi selittää eron aCA määrissä. APECED:ssa *AIRE* on mutatoitunut, jolloin TRA:a ei esitellä tymosyyteille normaalisti ja negatiivisessa selektiossa vapautuu autoreaktiivisia T-soluja. APECED:ssa aCA:a muodostuu tyyppi I IFN:a kohtaan jo 6-

36kk iässä (24). Kuitenkin APECED:n endokriiniset manifestaatiot voivat ilmetä huomattavasti myöhemmällä iällä (0,2 – 18v) (15). Tutkimusten perusteella aCA-pitoisuuksien avulla voidaan seurata taudin kulkua, mutta on epäselvää ovatko aCA:t sivutuote etenevästä autoimmuuniprosessista vai onko kyse jostakin muusta (3, 16, 24).

*AIRE*:n rooli voi olla tyymykselle luultua merkittävämpi, jolloin viallinen geeni aiheuttaa laajemman autoreaktiivisten T-solujen muodostumisen tai tyymyksen olosuhteiden muutoksen, mikä voi johtaa suurempiin häiriöihin B-solujen vastaainetuotannossa (3, 16). cGVHD:ssa autoimmuunireaktiota aiheuttavat T-solut voivat olla luovuttajan allo T-soluja tai omia, mahdollisesti aGVHD:n tyymusvaurion seurauksena syntyneitä auto T-soluja. Auto T-solujen muodostuessa taustalla on etenkin edeltävän aGVHD:n allo T-solujen aiheuttaman tyymusvaurion aikaansaama vaurio mTEC:lle, jolloin kaikkia TRA:a ei ilmennetä. Toisaalta tämä perustuu tällä hetkellä hiirikokeisiin ja tiedetään, että ihmisen ja hiiren immuunijärjestelmä eroavat toisistaan (10). Tyymusvaurio myös mahdollistaa auto T-solujen vuotamista ennen negatiivista selektiota verenkiertoon. Kuten APECED:ssa, negatiivinen selektio ei eläinkokeiden perusteella toimi cGVHD:ssa normaalisti (10). APECED:n taustalla oleva *AIRE*:n häiriö on ilmeisesti voimakkaampi kuin cGVHD:ssa, mikä mahdollisesti johtaa merkittävimpiin ongelmiin TRA:n esittelyssä ja negatiivisessa selektiossa sekä aiheuttaa suurempia muutoksia tyymyksen olosuhteissa.

aCA muodostumiseen vaikuttaa todennäköisesti muutkin tekijät kuin autoreaktiivisten T-solujen ja B-solujen välinen kommunikaatio, kuten esimerkiksi lisääntynyt autoreaktiivisten B-solujen selviäminen. Tästä syystä joudumme toistaiseksi spekuloidaan mikä aiheuttaa eron aCA:n ilmenemisessä cGVHD:ssa ja APECED:ssa sekä tyymoomassa. Joka tapauksessa aihe vaatii ehdottomasti lisätutkimusta, niin aCA:n etiologian ja biologisen merkityksen suhteen, kuin *AIRE*:n merkitysten osalta. Tarkempi tietämys *AIRE*:n vaikutuksista voisi tuoda ensinnäkin tarkennusta cGVHD:n patogeneesiin sekä aCA:n muodostumiseen, mutta myös lisäymmärrystä ja -hoitoja sairauksiin, jotka johtuvat autoreaktiivisista T-soluista.

## LÄHTEET

1. Murphy KW, C. Janeway's Immunobiology. 9th ed: Garland Science; 2016.
2. Flinn AM, Gennery AR. Treatment of Pediatric Acute Graft-versus-Host Disease-Lessons from Primary Immunodeficiency? *Frontiers in immunology*. 2017;8:328.
3. Arstila TP, Jarva H. Human APECED; a Sick Thymus Syndrome? *Frontiers in immunology*. 2013;4:313.
4. Porkka K. Kantasolujensiirrot. *Duodecim*. 2004;11.



5. Taskinen MR, S.; Vettenranta, K. Käänteishyljintä kantasolusiirroissa. *Duodecim*. 2017(3/2017):251-8.
6. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;124(3):374-84.
7. Taskinen M; Ryhanen SV, K. Käänteishyljintä kantasolusiirroissa. *Duodecim*. 2017;3/2017:251-8.
8. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(26):5401-11.
9. Hauri-Hohl MM, Keller MP, Gill J, Hafen K, Pachlatko E, Boulay T, et al. Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation. *Blood*. 2007;109(9):4080-8.
10. Dertschnig S, Nusspaumer G, Ivanek R, Hauri-Hohl MM, Holländer GA, Krenger W. Epithelial cytoprotection sustains ectopic expression of tissue-restricted antigens in the thymus during murine acute GVHD. *Blood*. 2013;122(5):837-41.
11. MacDonald KPA, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21.
12. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology*. 2016;7:507.
13. Zlotogora J, Shapiro MS. Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *Journal of medical genetics*. 1992;29(11):824-6.
14. Rosatelli MC, Meloni A, Meloni A, Devoto M, Cao A, Scott HS, et al. A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *Human genetics*. 1998;103(4):428-34.
15. Perheentupa J. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(8):2843-50.
16. Kisand K, Peterson P. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1246(1):77-91.
17. Kisand K, Lilic D, Casanova J-L, Peterson P, Meager A, Willcox N. Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: Clinical and pathogenetic implications. *European Journal of Immunology*. 2011;41(6):1517-27.
18. Vincent T, Plawewski M, Goulabchand R, Guilpain P, Eliaou JF. Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(6):528-35.
19. Meager A, Wadhwa M. Detection of anti-cytokine antibodies and their clinical relevance. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(8):1029-47.
20. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Trapnell BC, Nakata K. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: pathogenesis and mechanisms. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(4):263-73.
21. Browne SK. Anticytokine Autoantibody-Associated Immunodeficiency. *Annual Review of Immunology*. 2014;32(1):635-57.

22. Meyer S, Woodward M, Hertel C, Vlaicu P, Haque Y, Kärner J, et al. AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell*. 2016;166(3):582-95.
23. Seite JF, Shoenfeld Y, Youinou P, Hillion S. What is the contents of the magic draft IVIg? *Autoimmun Rev*. 2008;7(6):435-9.
24. Wolff AS, Sarkadi AK, Marodi L, Karner J, Orlova E, Oftedal BE, et al. Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type I features in early childhood. *J Clin Immunol*. 2013;33(8):1341-8.